

УДК 577.29+615.015+616.006

**ИЗБИРАТЕЛЬНАЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ БИНАЗЫ
В ОТНОШЕНИИ ФИБРОБЛАСТОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ
ОНКОГЕНЫ *ras* И AML/ETO**

*О.Н. Ильинская, П.В. Зеленихин, А.И. Колпаков, А.А. Макаров,
В.А. Митькевич, В.С. Прасолов, Д.Р. Сафиуллина*

Аннотация

В условиях ухудшения экологической обстановки возрастающая частота возникновения злокачественных новообразований у людей и животных остро ставит проблему поиска новых способов элиминации малигнизированных клеток из организма. В данной работе охарактеризована способность рибонуклеазы *Bacillus intermedius* (биназы) оказывать цитотоксическое действие на фибробласты, трансформированные онкогенами *ras*, *fms*, *src*, AML и AML/ETO. Установлено, что биназа способна избирательно подавлять жизнеспособность клеток, трансформированных онкогеном *ras*, чья экспрессия обязательна при колоректальной карциноме, и клеток, экспрессирующих химерный онкоген AML/ETO, характерный для острого миелоидного лейкоза.

Ключевые слова: бактериальные РНКазы, онкогены *ras*, *fms*, *src*, AML, AML/ETO, цитотоксичность.

Введение

Современная модель западной цивилизации направлена на сохранение каждой личности как уникальной и неповторимой части общества в течение как можно более длительного срока. Руководствуясь этой целью и развиваясь в этом направлении, медицина позволила уверенно отодвинуть границу полноценного существования человека в среднем до 70–80 лет. Однако в условиях отягчающегося с каждым годом состояния экологической обстановки сохранение дееспособности и здоровья в течение всей жизни человека становится все более трудным. Одной из граней данной проблематики, напрямую соотносящейся с экологической обстановкой в конкретном регионе, является увеличение частоты возникновения онкологических заболеваний, коррелирующее с загрязненностью окружающей среды. Среди подходов, призванных облегчить онкологический прессинг на человека, привлекает внимание поиск способов целенаправленной элиминации злокачественных клеток из организма путем избирательной индукции их апоптической гибели. Такой подход может быть реализован путем использования биопрепаратов, обладающих способностью селективно индуцировать апоптоз опухолевых клеток, являясь тем самым альтернативой классическим химиотерапевтическим препаратам, имеющим низкую избирательность действия.

Среди возможных кандидатов на роль таких биопрепаратов рибонуклеазы различных организмов, в частности рибонуклеазы бактерий. В настоящее вре-

мя особое внимание уделяется биологическим эффектам рибонуклеаз, таким, как контроль роста кровеносных сосудов, токсичность по отношению к клеткам опухолей, противовирусная активность. Современные представления о роли и функциях РНКаз в клетках позволяют рассматривать эти ферменты как перспективную альтернативу традиционным химиотерапевтическим средствам в щадящей терапии злокачественных новообразований. На сегодняшний день известно значительное количество РНКаз, обладающих селективным цитотоксическим действием по отношению к клеткам опухолей [1–3]. Наиболее известным ферментом этого ряда является РНКаз лягушки *Rana pipiens* – онконаза [4], которая успешно проходит стадию III клинических испытаний как противоопухолевый препарат в терапии злокачественных новообразований легких. Целенаправленный поиск терапевтически перспективных ферментов среди РНКаз млекопитающих не всегда тактически оправдан в связи с эволюционно сформировавшейся системой защиты клетки млекопитающих от излишней активности собственных РНКаз, опосредованной действием специфического цитозольного ингибитора РНКаз [5]. В связи с этим особое внимание на себя обращают РНКазы, филогенетически далекие от своих аналогов у млекопитающих, такие, как РНКазы амфибий, грибов и микроорганизмов, нечувствительные к действию ингибитора РНКаз млекопитающих [6]. Таким образом, отсутствие возможности у бактериальных рибонуклеаз быть инактивированными ингибитором РНКаз, а также широкие возможности для биоинженерии этих ферментов делает их весьма привлекательными для разработки новых терапевтических средств.

Поиск молекулярных клеточных мишеней, за счет которых реализуется механизм цитотоксической активности РНКаз, важен для обоснования принципов создания противоопухолевых препаратов селективного действия на их основе. Маркерами подверженности действию РНКаз или непосредственными мишенями их действия могут быть различные онкогены, экспрессирующиеся раковой клеткой и отличающие ее от нормальной.

В связи с вышесказанным целью настоящей работы стал анализ возможности селективного подавления роста рибонуклеазой *Bacillus intermedius* (биназой) культур фибробластов мыши, трансформированных онкогенами *ras*, *src*, *fms*, AML и AML/ETO, в сравнении с нормальными фибробластами.

1. Материалы и методы исследования

В работе использовали биназу – гуанилспецифичную РНКазу *Bacillus intermedius* 7P дикого типа (молекулярная масса 12.3 кДа, 109 аминокислотных остатков, pI = 9.5) [6]. Каталитическая активность биназы охарактеризована ранее по отношению к синтетическим субстратам [7] и высокополимерной дрожжевой РНК [8].

Исследование апоптогенных эффектов биназы проводили на нормальных фибробластах мыши NIH3T3 и SC-1 и трансгенных клетках, в которых осуществляется экспрессия активированных онкогенов *ras*-NIH3T3, *src*-NIH3T3, *fms*-NIH3T3, AML-SC-1 и AML/ETO-SC-1. Клетки выращивали в питательной среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma), 2 mM

глутамин и по 100 ед./мл пенициллина и стрептомицина при 37 °С в атмосфере 5% CO₂.

Антипролиферативное и цитотоксическое действие биназы оценивали в WST-тесте с использованием коммерческого реагента WST (Rosha Diagnostics, Германия), дающего в качестве восстановленного продукта окрашенную соль тетразолия в реакции с митохондриальными дегидрогеназами живых клеток, согласно методике, приведенной в работе Кука и Митчелла [9]. Посев клеточных культур производили в 96-ти луночные планшеты в количестве $1 \cdot 10^4$ клеток на лунку. В среду культивирования добавляли биназу в конечной концентрации 500 мкг/мл. Клетки инкубировали в течение 24, 48 и 72 ч, добавляли в лунки по 10 мкл WST-реагента и инкубировали еще 1 ч. Поглощение измеряли при 450 нм на мультиплащечном ридере EL_x-800 (США). Падение жизнеспособности обработанных РНКазой культур выражали в процентах по отношению к активности митохондриальных дегидрогеназ клеток, выращенных за то же время без обработки.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерной программы "Microsoft Excel".

2. Результаты и обсуждение

Экспериментальные данные по оценке изменения жизнеспособности нормальных и онкотрансформированных фибробластов под действием биназы в зависимости от времени культивирования представлены на рис. 1. Прежде всего необходимо отметить, что различные линии клеток обладают разной чувствительностью по отношению к цитотоксической РНКазе. Как представлено на рис. 1, фибробласты, трансформированные *ras*-онкогеном, онкогенами AML и AML/ETO, оказались более чувствительны к действию бактериального фермента. Это согласуется с данными литературы для цитотоксических мутантов РНКазы Sa [10] и онконазы [11]. Вместе с тем биназа (500 мкг/мл) была относительно токсична и для нормальных фибробластов линии SC-1, снижая их жизнеспособность через 72 ч культивирования до 20% по сравнению с необработанными биназой клетками SC-1. Цитотоксическое действие биназы через 72 ч культивирования привело к снижению жизнеспособности фибробластов, трансформированных *ras*-онкогеном, онкогенами AML и AML/ETO, до 39, 21 и 5% соответственно. Клетки NIH3T3, трансформированные онкогенами *fms* и *src*, токсическому действию РНКазы не подвергались. Принимая во внимание высокую чувствительность клеток линии SC-1 к действию биназы, можно сделать вывод, что биназа оказывает преимущественное токсическое действие на фибробласты, трансформированные онкогенами *ras* и AML/ETO. Таким образом, можно сделать предположение о существовании целого спектра клеточных детерминант действия цитотоксичных катионных РНКаз, отличных от прямой молекулярной мишени действия ферментов – РНК. Некоторые структуры, детерминирующие определенный характер действия РНКазы на живую клетку, были уже обнаружены и описаны ранее.

Так, известно, что действие биназы на клетки эмбриональной почки, не содержащие искусственно внесенные кальций-зависимые калиевые каналы (НЕК283), оказывается более выраженным. Тем же характером действия на клетки НЕК

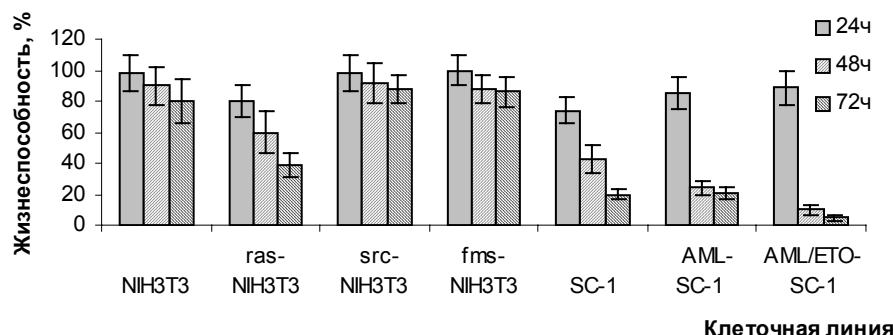


Рис. 1. Выживаемость нормальных и онкотрансформированных фибробластов при действии биназы (500 мкг/мл) в зависимости от времени культивирования

обладали цитотоксичные катионные мутанты 5К и 7К РНКазы *Streptomyces aureofaciens*, исходя из чего было сделано заключение, что данный тип ионных каналов вносит вклад в преодоление цитотоксического действия РНКаз [12].

Важно отметить, что выбранные нами для исследования онкогены относятся к группе регуляторных белков, кодирующих элементы сигнальной сети клетки. Онкоген *ras* – это G-белок, мутации которого сопровождают более 25% случаев рака у человека и обязательно обнаруживаются при определенных видах рака, например колоректальной карциноме; при исследовании индукции опухолей животных такие мутации зарегистрированы в 20–60% случаев [13]. *C-src* является полифункциональным белком, принимающим участие в регуляции различных процессов клетки в норме и при малигнизации: пролиферации клеток и их дифференциации, ответе на стресс, функциональной активности дифференцированных клеток. [14]. Активность *C-src* проявляется через его взаимодействие с рядом различных клеточных структур, таких, как рецепторы факторов роста, молекулы интегринов и клеточных факторов адгезии, рецепторы стероидных гормонов, компоненты сигнальных путей. *Fms*-онкоген – рецептор колониестимулирующего фактора макрофагов, принимающий участие в процессах дифференциации моноцитов и макрофагов, имплантации эмбриона в стенку матки и развития плаценты, дифференцировки тканей молочной железы. Экспрессия активированного *fms*-онкогена характерна для большинства случаев опухолей груди и яичников у женщин [15] и простаты у мужчин [16]. Белок AML-1 является частью транскрипционного фактора, необходимого для нормального кроветворения. Мутации гена AML часто фиксируются в случаях острых миелогенных лейкозов. В результате транслокации между 8-й и 21-й хромосомами образуется химерный ген AML/ETO, являющийся одной из наиболее часто встречающихся aberrаций при миелогенном лейкозе. Конститутивная экспрессия гена AML/ETO повышает частоту встречаемости самоподдерживающихся клеток и при наличии дополнительной мутации создает опухолевый фенотип [17].

Принимая во внимание вышесказанное, результаты наших исследований позволяют считать катионные каталитически активные бактериальные РНКазы перспективными для создания новых средств щадящей противоопухолевой те-

рапии, альтернативных классическим ДНК-повреждающим агентам, обладающим невысокой селективностью действия. Эффективность и селективность действия таких средств будет зависеть от спектра онкогенов, экспрессирующихся определенным типом раковых клеток.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» (ГК № 02.512.12.2014), «Развитие научного потенциала высшей школы (РНП.2.1.1.1005), РФФИ (проект № 07-04-01051) и НИОКР АН РТ (ГК 03-3.5.2/2008 (ФП)).

Summary

O.N. Ilinskaya, P.V. Zelenikhin, A.I. Kolpakov, A.A. Makarov, V.A. Mitkevich, V.S. Prasolov, D.R. Safiullina. Selective Cytotoxicity of Binase towards Fibroblasts with Expression of the *ras*- and AML/ETO Oncogenes.

Empairment of environmental and ecological conditions leads to increasing of malignant neoplasia number in humans and animals. Therefore, it is necessary to investigate new ways for elimination of malignant cells from the organism. In present study we characterized the ability of *Bacillus intermedius* ribonuclease (binase) to cause cytotoxic effects in mouse fibroblasts transformed with *ras*-, *fms*-, *src*-, AML- and AML/ETO oncogenes. It was shown that binase selectively inhibits viability of cells transformed with *ras*- and AML/ETO oncogenes.

Key words: bacterial ribonucleases, *ras*-, *fms*-, *src*-, AML-, AML/ETO oncogenes, cytotoxicity.

Литература

1. Leland P., Raines R. Cancer chemotherapy – ribonucleases to the rescue // Chemistry and Biology. – 2001. – V. 8. – P. 405–413.
2. Spalletti-Cernia D., Sorrentino S., Gaetano S. Di, Piccoli R., Santoro V., D'Alessio G., Laccetti P., Vacchio G. Highly selective toxic and proapoptotic effects of two dimeric ribonucleases on thyroid cancer cells compared to the effects of doxorubicin // Brit. J. Cancer. Res. – 2004. – V. 90. – P. 270–277.
3. Ильинская О.Н., Макаров А.А. Почему рибонуклеазы вызывают гибель раковых клеток // Мол. биол. – 2005. – Т. 39, № 1. – С. 1–11.
4. Saxena S.K., Shogen K., Ardelt W. Onconase and its therapeutic potential // Lab. Med. – 2003. – V. 34. – P. 380–387.
5. Sevcik J., Urbanikova L., Leland P.A., Raines R.T. X-Ray structure of two crystalline forms of a Streptomyces ribonuclease with cytotoxic activity // J. Biol. Chem. – 2002. – V. 277. – P. 47325–47330.
6. Schulga A., Kurbanov F., Kirpichnikov M., Protasevich I., Lobachev V., Ranjbar B., Chekhov V., Polyakov K., Engelborghs Y., Makarov A. Comparative study of binase and barnase: experience in chimeric ribonucleases // Protein Engin. – 1998. – V. 11. – P. 773–780.
7. Yakovlev G.I., Moiseyev G.P., Struminskaya N.K., Borzykh O.A., Kipenskaya L.V., Znamenskaya L.V., Leschinskaya I.B. Mutational analysis of the active site of RNase of *Bacillus intermedius* (BINASE) // FEBS Lett. – 1994. – V. 354. – P. 305–306.
8. Ilinskaya O.N., Ivanchenko O.B., Karamova N.S., Kipenskaya L.V. SOS-inducing ability of native and mutant microbial ribonucleases // Mut. Res. – 1996. – V. 354. – P. 203–209.

9. Cook J.A., Mitchell J.B. Viability measurements in mammalian cell systems // *Anal Biochem.* – 1989. – V. 15, No 179(1). – P. 1–7.
10. Ilinskaya O.N., Dreyer F., Mitkevich V.A., Shaw K.L., Pace C.N., Makarov A.A. Changing the net charge from negative to positive makes ribonuclease Sa cytotoxic // *Protein Sci.* – 2002. – V. 11, No 10. – P. 2522–2525.
11. Jordanov M.S., Ryabinina O.P., Wong J., Dinh T.H., Newton D.L., Rybak S.M., Magun B.E. Molecular determinants of apoptosis induced by the cytotoxic ribonuclease onconase: evidence for cytotoxic mechanisms different from inhibition of protein synthesis // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60, No 7. – P. 1983–1994
12. Ilinskaya O.N., Koschinski A., Mitkevich V., Repp H., Dreyer F., Pace C.N., Makarov A.A. Cytotoxicity of RNases is increased by cationization and counteracted by K_{Ca} channels // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2004. – V. 314, No 2. – P. 550–554.
13. Sills R.C., Boorman G.A., Neal J.E., Hong H.L., Devereux T.R. Mutations in *ras* genes in experimental tumor of rodents // *IARC Sci. Publ.* – 1999. – V. 146. – P. 55–86.
14. Thomas S.M., Brugge J.S. Cellular functions regulated by Src family kinases // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 1997. – V. 13. – P. 513–609.
15. Ramakrishnan S., Xu F.J., Brandt S.J. Constitutive production of macrophage colony-stimulating factor by human ovarian and breast cancer cell lines // *J. Clin. Invest.* – 1989. – V. 83. – P. 921–926.
16. Ide H., Seligson D.B., Memarzadeh S. Expression of colony-stimulating factor 1 receptor during prostate development and prostate cancer progression // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – V. 99. – P. 14404–14409.
17. Licht J.D. AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML // *Oncogene.* – 2001. – V. 20. – P. 5660–5679.

Поступила в редакцию
29.09.08

Ильинская Ольга Николаевна – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: Olga.Ilinskaya@ksu.ru

Зеленихин Павел Валерьевич – кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: pasha_mic@mail.ru

Колпаков Алексей Иванович – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией Биосинтеза и биоинженерии ферментов кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: Alexei.Kolpakov@ksu.ru

Макаров Александр Александрович – доктор биологических наук, директор Института молекулярной биологии РАН, г. Москва.

E-mail: aamakarov@genome.eimb.relarn.ru

Митькевич Владимир Александрович – кандидат химических наук, старший научный сотрудник Института молекулярной биологии РАН, г. Москва.

E-mail: vmitkevich@mail.ru

Прасолов Владимир Сергеевич – доктор биологических наук, заведующий лабораторией биологии клетки Института молекулярной биологии РАН, г. Москва.

E-mail: prasolov@eimb.ru

Сафиуллина Дарья Радиевна – студент кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: daria.safiullina@gmail.com